

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DISGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE MILHO MOÍDO SOB TRÊS  
NÍVEIS DE ENZIMA AMIOLÍTICA EXÓGENA**

Paula Lobo Ferreira de Assis  
Orientador: João Teodoro Padua

GOIÂNIA  
2012



PAULA LOBO FERREIRA DE ASSIS

**DISGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE MILHO MOÍDO SOB TRÊS  
NÍVEIS DE ENZIMA AMIOLÍTICA EXÓGENA**

Dissertação apresentada para obtenção  
do grau de Mestre em Ciência Animal  
junto à Escola de Veterinária e Zootecnia  
da Universidade Federal de Goiás.

**Área de Concentração:**  
Produção Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. João Teodoro Padua – EVZ/UFG

**Comitê de Orientação:**

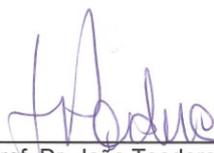
Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira - ICB/UFG

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa - ICB/UFG

GOIÂNIA  
2012

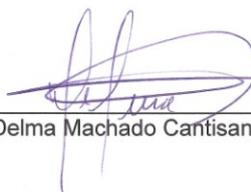
**PAULA LOBO FERREIRA DE ASSIS**

Dissertação defendida e aprovada em **31/08/2012**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



---

Prof. Dr. João Teodoro Pádua  
(ORIENTADOR (A))



---

Profa. Dra. Delma Machado Cantisani Pádua – PUC/GO



---

Profa. Dra. Eliane Sayuri Miyagi

Dedico este trabalho em primeiro lugar a DEUS que está permitindo a realização desta conquista, dedico também as meus pais e irmãos pelo apoio, compreensão e por todos os momentos compartilhados.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar presente em cada momento de minha vida e aos meus amados pais Paulo Ferreira de Assis e Rosa Cristina Lobo de Assis, por serem fundamentais na minha formação pessoal e profissional, estando sempre ao meu lado com total apoio e incentivo, acreditando na minha capacidade e no meu sucesso, e principalmente por serem exemplos em minha vida.

Aos meus irmãos Bruno e Verônica, por serem essenciais na minha vida, obrigada pela amizade e confiança.

À Dra. Cristine dos Santos Settimi Cysneiros por todo o apoio, sempre presente e disposta a ajudar e principalmente pela amizade conquistada neste período.

Ao professor Dr. João Teodoro Padua, pela orientação e apoio durante todo este trabalho.

Aos professores Dr. Reginaldo Nassar Ferreira e Dr. Cirano José Ulhôa, por contribuírem para minha formação, e grande auxílio durante o desenvolvimento e execução deste trabalho, por terem me dado à oportunidade de conduzir este projeto.

Aos amigos, Leonardo Oliveira, Bruno Fortes, Hugo Jaime, Douglas Lima, Camila, Júlio Piestch e Sátia de Castro, pela amizade e pela ajuda nas horas boas e principalmente nas horas de dificuldade.

Aos recentes amigos, Edmom, Franciele, Telson, Indiara, Ane, Paloma, Wesley, Renan, Taiane, Jirene e os não tão recentes, mas nem por isso menos amados, Maruza, Marilla, Saulo, Humberto, Athos, Marina, Camila, Mayana, Sheridan, Rafaela, Priscila, por fazer meus dias mais confortáveis.

Aos amigos do trabalho, Edglei, Renata, Sirlene, Lorena, Mayra, e todos do Núcleo Regional Centro, em nome da Adriana Janzen, agradeço pelo incentivo, compreensão e apoio prestado durante a conclusão deste trabalho.

À Coordenação e todos os professores da Escola de Veterinária e Zootecnia, que contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários da secretaria de Pós Graduação e do Departamento de Produção Animal, pelo suporte nas nossas necessidades acadêmicas.

A todos aqueles que me apoiaram nesta caminhada.

**SUMÁRIO**

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Digestibilidade.....	3
2.2 Amido.....	4
2.3 Enzimas.....	8
2.4 Aditivos Enzimáticos.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Local e período experimental.....	12
3.2 Linhagem utilizada e manutenção do fungo.....	12
3.3 Produção da solução de enzimas amilolíticas.....	12
3.4 Ensaio Enzimático.....	13
3.5 Digestibilidade “in vitro” da matéria seca do milho e delineamento e experimental.....	13
3.6 Análise estatística.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Estrutura química da amilose.....	5
Figura 2	Estrutura química da amilopectina.....	6
Figura 3	Classificação das enzimas amilolíticas.....	9
Figura 4	Etapas da preparação do líquido ruminal.....	14
Figura 5	Curvas de digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do milho moído submetido a 3 níveis de adição enzimática.....	19
Figura 6	Regressão da digestibilidade da matéria seca em relação ao nível de adição enzimática nos tempos 0, 12 e 24 horas.....	21
Figura 7	Gráfico 3D da digestibilidade " <i>in vitro</i> " da matéria seca do milho em relação à dose enzimática e ao tempo.....	23

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Fontes de amido.....	7
Tabela 2	Medias dos valores de digestibilidade in vitro (%) da matéria seca do milho moído nos tempos de incubação .....	17
Tabela 3	Valores dos parâmetros da degradação da matéria seca: fração solúvel (a), fração potencialmente degradável (b), degradabilidade efetiva a taxa de passagem de 2% (DE 2%), 5% (DE 5%) e 8% (DE 8%), tempo de colonização (Lag time), degradação potencial (DP), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e coeficiente de determinação ajustado( $R^2$ Ajustado).....	20
Tabela 4	Valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), coeficiente de determinação ajustado( $R^2$ Ajustado) e coeficiente de variação das curvas de regressão da digestibilidade da matéria seca em relação ao nível de adição enzimática nos tempos.....	22

## RESUMO

Complexo enzimático em dietas a base de milho tem como principal objetivo a maximização dos nutrientes inseridos na dieta e, com isso, melhorar os resultados zootécnicos. Este trabalho teve por objetivo produzir complexo enzimático amilolítico, utilizando o fungo *Aspergillus awamorii* e avaliar a digestibilidade *in vitro* de milho moído submetido a três níveis de enzima amilolítica exógena, encubado em líquido ruminal de bovino. Os tratamentos são: tratamento controle (sem enzima), nível 1 (com 5 ml de enzima), nível 2 (com 10 ml de enzima) e nível 3 (20 ml de enzima). A adição de enzimas amilolíticas influenciou ( $P < 0,05$ ) positivamente no aumento da degradação do milho no nível 3 até o tempo de 24h em relação ao tratamento controle, podendo este fato ser atribuído à atuação enzimática no substrato a partir do momento que foi aplicada a enzima. No tempo de 48 horas não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, indicando que houve uma compensação na digestibilidade da matéria seca entre os tratamentos após as 24 horas para o tratamento controle e após as 18 horas para os níveis 1 e 2, fato este podendo ser aliado ao fato de haver atividade proteolítica no líquido ruminal presente nos jarros do fermentador, que por sua vez poderá destruir as enzimas inativando-as. O tempo de colonização do milho foi reduzido pela adição enzimática, fato atribuído à ação enzimática aumentando a superfície de contato. No presente trabalho as doses que apresentaram maior digestibilidade foram de 17,8 e 16,4 mL para os tempos 0 e 24 horas de incubação respectivamente, correspondendo a 769,2 e 708,7 unidades enzimáticas/ Kg de matéria seca do milho. A adição de enzimas amilolíticas exógenas melhorou a digestibilidade “*in vitro*” da matéria seca do milho moído sendo o melhor nível de adição enzimática, para as taxas de passagem acima de 4%, entre 708,7 e 769,2 unidades enzimáticas/ Kg de matéria seca do milho.

Palavras-chave: amido, *Aspergillus awamori*, biotecnologia, bovinos, ruminantes.

## ABSTRACT

In cattle, the number is constant research involving feed additives, in order to achieve high productivity and improvements in diet formulation. Among the alternative additives there are the enzymes which are proteins catalysts of chemical reactions involved in the metabolic process the entire animal organism. The efficiency of enzymes in diets based on alternative foods has encouraged its use, representing a major breakthrough in nutrition. Enzyme complex in diets based on corn has as main objective the maximization of nutrients included in the diet and thereby improve outcomes husbandry. This study aimed to produce an amyolytic enzyme complex, using the fungus *Aspergillus awamori* and evaluate the in vitro digestibility of corn subjected to three levels of exogenous enzyme amylase. The treatments were: control (without enzyme), the first level (with 5 ml of enzyme), level 2 (with 10 ml of enzyme) and level 3 (20 ml enzyme). The experiment was conducted in the Laboratório de Enzimologia e Laboratório de Fisiologia da Digestão do Instituto de Ciências Biológicas/ICB II, da Universidade Federal de Goiás. The addition of amyolytic enzymes had a positive influence on increasing the degradation of corn at level 3 until the time of 24h compared to control treatment, this fact may be attributable to enzymatic activity on the substrate from the time that the enzyme was applied. At the time of 48 hours was not significantly different between treatments, indicating that there was compensation in the digestibility of dry matter between treatments after 24 hours for the control treatment and after 18 hours for levels 1 and 2, this fact may be coupled with the fact that there proteolytic activity in the rumen fluid present in the fermenter jars, which in turn can destroy the enzymes inactivating them. The time of colonization of maize was reduced by adding enzyme, which was attributed to the enzymatic action of increasing surface contact and providing oligosaccharides smaller chains for bacteria, providing better conditions for bacterial growth. In the present study doses with higher digestibility were 17.8 and 16.4 ml for times 0 and 24 hours incubation respectively, corresponding to 769.2 and 708.7 enzyme units / kg of dry corn. The addition of exogenous amyolytic enzymes improved the "in vitro" dry matter of ground corn with the level of enzyme addition to passage rates above 4%, between 708.7 and 769.2 units enzyme / kg Maize dry matter

Key words: *Aspergillus awamori* , biotechnology, ruminant, starch

## 1. INTRODUÇÃO

Quando o assunto é criação de bovinos, torna-se constante o número de pesquisas que envolvem a busca por aditivos que possam contribuir para eficiência no consumo de alimentos. Entretanto, é notável a carência de dados obtidos no Brasil sobre a utilização de aditivos enzimáticos, como uma forma de auxiliar a eficiência alimentar e reduzir custos na alimentação.

Hoje, os nutricionistas tem o desafio de ajustar a quantidade e a qualidade da ração a ser balanceada, baseando-se nas exigências dos animais e levando em conta o alto custo dos alimentos. Assim, a busca é cada vez maior por alternativas, que melhorem o aproveitamento do alimento escolhido e maximize a viabilidade da produção de carne bovina.

Com o intuito de se obter alta produtividade e melhorias na criação de bovinos, implica, geralmente, na formulação de dietas com altos teores de amido. O amido é um dos principais nutrientes utilizados na dieta de ruminantes devido a sua importância em promover altos níveis de produção. A principal fonte de amido na dieta vem dos grãos de cereais, mais comumente do milho e do sorgo (THEURER, 1986).

Por isso, a ótima utilização do amido é fundamental para melhorar a eficiência da produção animal, e a enzima é um aditivo que pode estar contribuindo para o melhor aproveitamento deste alimento, auxiliando na conquista de melhores resultados.

A utilização de suplementos enzimáticos para manipular a digestão ruminal do amido, pode permitir melhora na produtividade além de atuar como um substituto dos promotores de crescimentos nas dietas dos animais de produção (SOUZA et al., 1996).

Estes aditivos alimentares têm sido incorporados aos alimentos com o objetivo de melhorar a eficiência de produção dos animais pelo aumento da digestão de produtos de baixa qualidade e redução na perda de nutrientes nas fezes, sendo possível baixar os níveis nutricionais da dieta com possíveis vantagens econômicas (FLORES et al., 1994). O uso de enzimas amilolíticas exógenas apresentam-se promissores uma vez em que as rações podem conter altos níveis de inclusão de grão proporcionando níveis elevados de amido na dieta (BRITO, 2010).

Devido ser extremamente sensíveis as enzimas necessitam de condições específicas para atuarem corretamente. Os fatores que podem influenciar sobre a eficiência da ação enzimática são: a concentração de substrato, o pH e a temperatura. Por suas características as enzimas são ativas em uma faixa estreita de pH e são sensíveis às mudanças de acidez ou alcalinidade em seu meio. Comparadas a reações químicas, agem muitas vezes sob condições relativamente brandas em termos de temperatura e de acidez (WANDERLEY et al., 2011).

Estudos mostram que a adição de misturas enzimáticas pode melhorar a digestão de nutrientes e o desempenho animal. Contudo, o modo de ação das enzimas não está completamente elucidado. Evidências sugerem que o mecanismo de ação não é simples e pode ser o efeito de vários fatores (BEAUCHEMIN et al., 1998; MCALLISTER et al., 2001).

Para ROJO RUBIO et al. (2007) quando se fala em suplementação animal com adição de enzimas amilolíticas como opção de melhorar a digestibilidade da ração e o desempenho animal, nos deparamos com resultados controversos e algumas vezes não conclusivos, devido ao baixo número de pesquisas realizadas com o intuito de avaliar a aplicação desta biotecnologia.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca de milho moído, quando submetidos a níveis diferentes de enzima amilase.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Digestibilidade

A digestão é um processo de conversão de macromoléculas do alimento para composto simples que podem ser absorvidos a partir do trato gastrointestinal. Medidas de digestibilidade têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de sistemas, a fim de descrever o valor nutritivo dos alimentos (VAN SOEST, 1994).

A técnica de digestão *in vitro* proposta por TILLEY & TERRY (1963) tem sido largamente utilizada para prever a digestibilidade *in vivo*. Essa técnica tem por objetivo simular as condições normais do rúmen, com atmosfera anaeróbica, temperatura de incubação constante e pH ótimo, conforme proposto por WARNER (1956) como rúmen artificial.

Segundo DUTRA et al. (1997) a digestibilidade é um dos parâmetros mais importantes para avaliação do valor nutritivo de um alimento. A digestibilidade do alimento irá refletir sobre seu aproveitamento pelos microrganismos do rúmen e expressar a capacidade do animal em utilizar, em maior ou menor escala, seus nutrientes (MARTINS et al., 2000).

No estudo da digestibilidade a partir de equipamentos automatizados de fermentação *in vitro*, existem várias fontes de variação que podem interferir na metodologia, como: as variações na população microbiana, quantidade de amostras, diferenças atribuídas ao meio e variações de procedimentos, infusão de nitrogênio, inóculo, espécie animal, tipo de dieta e pH (JOHNSON et al., 1966).

Como fonte de variação também é importante resaltar a potencial ocorrência de efeito associativo na digestão de amostras incubadas em um mesmo jarro de fermentação (ADESOGAN, 2005).

WILMAN & ADESOGAN (2000) concluíram que o escape de compostos solúveis de amostras com elevadas concentrações dessas substâncias poderia influenciar a população microbiana e, desta forma, aumentar a degradação da parede celular de alimentos com baixo teor destas substâncias e incubados no mesmo jarro de fermentação. No entanto, HOLDEN (1999) não observou diferença nos valores de digestibilidade *in vitro*

da matéria seca de diversos alimentos volumosos e concentrados, quando incubados no mesmo jarro de fermentação ou em jarros de fermentação diferentes.

A digestibilidade *in vitro* da matéria seca é altamente correlacionada com a digestibilidade *in vivo* (MARTEN & BARNES, 1980). O sistema *in vitro* é útil para rotina de avaliação de forragens e produz resultados com alta precisão e repetibilidade (BARNES, 1965).

Muitos fatores podem influenciar a digestibilidade da MS, incluindo a fonte e a atividade do inóculo. Diversos estudos têm indicado que, no método *in vitro*, a digestibilidade da MS ou da fibra inicia-se na própria forragem, independentemente da fonte de inóculo ruminal (MARINUCCI et al., 1992).

Estudos indicam que há efeitos significativos da fonte de inóculo sobre a digestibilidade da MS (NELSON et al., 1973; GRANT et al., 1974). CHERNEY et al. (1993) estudando a influência de vacas doadoras e fontes de fibra sobre a digestibilidade *in vitro* de MS de silagem de milho e de alfafa, com período de incubação de 48 horas, acrescentando solução de extração de NDF (fibra em detergente neutro), concluíram que a fonte de fibra na dieta de vaca doadora de líquido ruminal e o método de filtração do líquido podem afetar a digestibilidade *in vitro*.

Existe, hoje, uma variedade de alimentos que podem ser utilizados na alimentação de ruminantes. Entretanto, seu valor nutricional e sua qualidade são determinados por complexa interação entre os nutrientes e os microrganismos do trato digestivo, nos processos de digestão, absorção, transporte e utilização de metabólitos, além da própria condição fisiológica do animal (MARTINS et al., 2000).

Eficiência no consumo de alimentos é um componente chave na formulação de rações e estratégias de alimentação para otimizar a rentabilidade da produção (RODRIGUES, 1998), pois o desempenho animal é primeiramente definido pelo consumo voluntário, já que este determina o nível de ingestão de nutrientes (VAN SOEST, 1994).

## 2.2. Amido

Dietas com a inclusão de ingredientes com alto teor de amido resultam em alterações no trato digestivo dos bovinos e uma deficiência na digestão dessa fonte de amido, representa perdas de nutrientes pelas fezes. ROJO et al. (2005) avaliando a eficiência no aproveitamento do amido proveniente do grão do sorgo observou aumento no ganho de peso diário de cordeiros que receberam amilase na ração e segundo dados do autor o incremento de 13,9%.

Segundo VAN SOEST (1994), o amido tem alta digestibilidade, todavia, a extensão da digestão do amido no rúmen pode ser influenciada pelos seguintes fatores: endosperma, processamento do grão, nível de ingestão do amido, interação proteína e amido, integridade celular e pela presença de inibidores.

Outro aspecto de real importância é a relação amilose:amilopectina na composição do amido. O amido é um polissacarídeo heterogêneo composto principalmente de moléculas de amilose e de amilopectina, ligadas por pontes de hidrogênio (VAN SOEST, 1994).

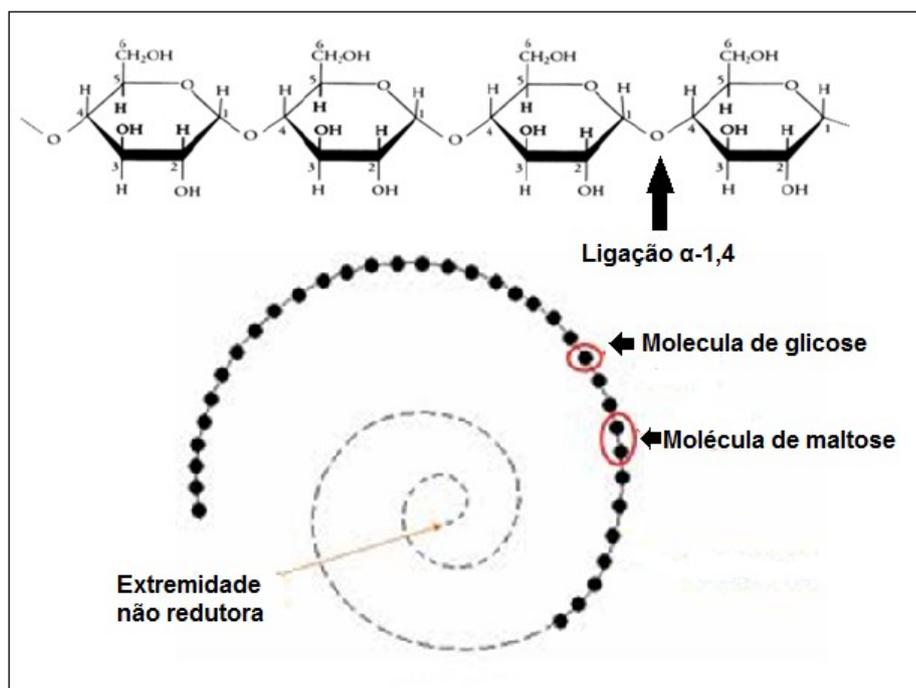


FIGURA 1 Estrutura química da amilose.

Fonte: Adaptado de KOZLOSKY (2009).

A amilose é um polímero linear de unidades de glicose unidas com ligações tipo  $\alpha$ -1,4 (Figura 1), enquanto que a amilopectina (Figura 2) é um polímero ramificado, formado por uma cadeia linear de resíduos de glicose ( $\alpha$ -1,4) com pontos de ramificação  $\alpha$ -1,6 a cada 20 a 25 unidades.

Segundo KOTARSKI et al., (1992) a proporção de amilose no grânulo de amido varia de 14 a 34%, enquanto que a amilopectina representa cerca de 70 a 80% do amido nos grãos de milho. Para BULEÓN et al., (1998); MORAES, (2004) a média do conteúdo de amilose pode variar de valores próximos a zero chegando a 75%, mas o valor típico é de 20 a 25%.

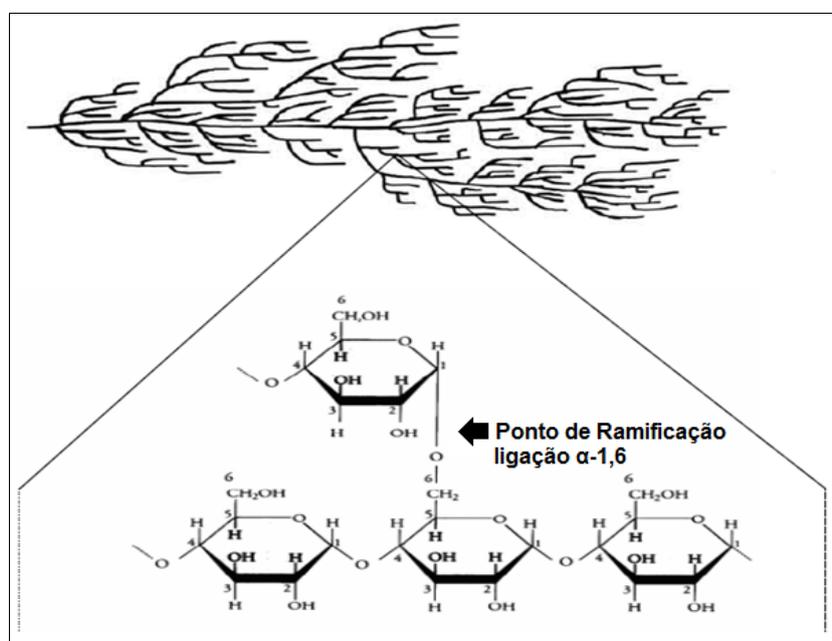


FIGURA 2 Estrutura química da amilopectina

Fonte: Adaptado de KOZLOSKY (2009).

A proporção desse polímero linear (amilose) e ramificado (amilopectina) presente nos grãos influencia a taxa de degradação e a digestibilidade do amido. Ou seja, a digestibilidade do amido é inversamente proporcional ao teor de amilose. Desta forma, fontes de amido com maiores teores de amilopectina, como o grão de milho imaturo, podem apresentar maior digestibilidade (JOBIM et al., 2003).

O amido que chega ao rúmen é degradado principalmente pela atividade das bactérias amilolíticas, sendo uma menor proporção do amido hidrolisado por fungos e protozoários (HUNTINGTON, 1997).

A quantidade de amido presente em cada alimento é variável (Tabela 1) sendo usados estes valores para o balanceamento das dietas oferecidas para os animais (ROSTAGNO, 2005).

TABELA 1 Fontes de amido

<b>Fonte</b>	<b>Amido %</b>
Arroz quirera	74,45
Arroz farelo	22,70
Arroz farelo desengordurado	26,00
Farelo de glúten milho	21,53
Gérmen de milho	48,56
Mandioca integral raspa	67,85
Milheto	63,29
Milho	62,48
Milho alta Gordura	59,00
Milho Alta Lisina	65,37
Milho pré cozido	61,00
Resíduo de biscoito	46,50
Soja farelo	12,38
Soja integral extrusada	6,70
Sorgo alto tanino	56,80
Sorgo baixo tanino	60,79
Trigo	54,93
Trigo farelo	31,35
Trigo farinha	76,50
Trigo gérmen	15,45

Fonte: Adaptado de ROSTAGNO (2005)

Segundo HUNTINGTON (1994) um aumento na proporção de amido degradado no rúmen se traduz em aumento da eficiência alimentar (ganho de peso/kg de alimento), e também aumento no teor de proteína no leite. De acordo com DEMARQUILLY (1996), isso é contrário a teoria que sugere que o amido é utilizado mais eficazmente quando é digerido e absorvido sob forma de glicose no intestino delgado, em relação à degradação para AGV no rúmen. O autor destaca que de fato a digestão do amido no rúmen tem dupla vantagem: 1) aumento da síntese de proteína microbiana no rúmen; 2) aumento na digestibilidade no intestino delgado do amido "by pass", devido ao aumento na

secreção do pâncreas, em resposta a uma maior quantidade de proteínas que chegam ao intestino delgado.

### 2.3. Enzimas

As amilases estão entre as primeiras enzimas conhecidas. Promovem a hidrólise do amido em açúcares redutores, sendo detectadas há mais de um século em grande variedade de materiais biológicos. Foram descritas em 1811 nos extratos de trigo; em 1831 na saliva; em 1833 no malte; em 1846 no sangue; e em 1881 produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* (HARGER, 1982).

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam (HARGER, 1982), portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido (amilo). As amilases atuam sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos hidrolisando as ligações glicosídicas e variam de peso e conformação conforme organismo que a produz.

Apesar de nos últimos anos as amilases microbianas terem recebido mais atenção dos pesquisadores, devido sua maior termoestabilidade, a liquefação do amido por aquelas enzimas tem se constituído na unidade operacional mais cara do processo de sacarificação, principalmente por serem produzidas por fermentação submersa. Assim, no campo da biotecnologia pesquisas sobre a produção de amilases termoestáveis de menor custo, são recomendadas (SOUZA et al., 1996).

As amilases têm a capacidade de quebrar as ligações glicosídicas  $\alpha$  (1,4) e  $\alpha$  (1,6) das moléculas de amilose e amilopectina, liberando diversos fragmentos. Contudo nem todas as bactérias possuem todas as enzimas necessárias para promover todo o processo de degradação do amido até glicose, existindo diversas endo e exo amilases do tipo  $\alpha$  (1,4) e  $\alpha$  (1,6). Desta forma a sintonia entre as diversas espécies de bactérias é fundamental para a fermentação do amido (HUNTINGTON, 1997).

As amilases podem ser divididas em três grupos de acordo com o tipo de ligação que hidrolisam: as  $\alpha$ -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases), as  $\beta$ -amilases, que hidrolisam unidades

das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases), e as glucoamilases (amiloglicosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (MORAES, 2004).

Atualmente são conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos e a ação combinada de várias enzimas é necessária para a completa hidrólise do amido. COSTA (1996) apresenta um esquema (Figura 3) para identificar e classificar as enzimas amilolíticas.

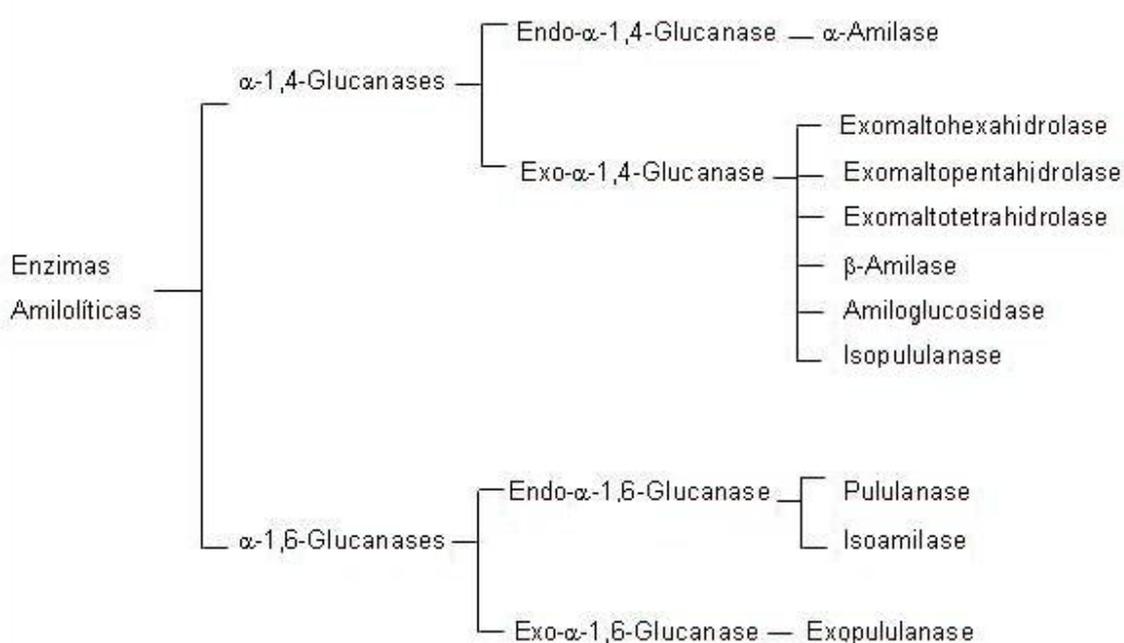


FIGURA 3 Classificação das enzimas amilolíticas

Fonte: COSTA (1996).

Por meio da sua ação hidrolítica, a  $\alpha$ -amilase hipoteticamente aumenta a disponibilidade de produtos da hidrólise do amido no rúmen, conseqüentemente alterando o processo de fermentação ruminal (TRICARICO et al., 2008). Efeito quadrático também foi observado com o decréscimo da produção a medida que se aumenta a proporção de fornecimento do suplemento enzimático (SAN EMETERIO et al. (2000); KLINGERMAN et al., (2009) .

HRISTOV et al. (2008), utilizando baixas concentrações dos complexos enzimáticos contendo amilases não, obtiveram nenhum efeito sobre a fermentação, síntese de proteína microbiana e a digestão de nutrientes em vacas leiteiras.

São adotadas várias unidades de medida da atividade amilolítica das enzimas utilizadas na suplementação de animais nos trabalhos científicos. HRISTOV et al. (2008), adicionando a enzima diretamente no rúmen utilizaram a formação de açúcares redutores (FUWA, 1954), de acordo com o tempo em um determinado pH. WALSH et al. (2005), propuseram um método de difusão radial em ágar para quantificação das enzimas adicionadas na alimentação animal, TRICARICO et al. (2007) e DE FRAIN et al. (2005), adotaram a unidade dextrinizante como medida da atividade das amilases e esta sendo a quantidade de enzimas necessárias para degradar o amido na velocidade de 1g/h a 30°C em pH 4,8 (FOOD CHEMICAL CODEX, 1996).

#### 2.4. Aditivos Enzimáticos

Enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária e quaternária, que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações químicas no organismo, sem serem, elas próprias alteradas (CHAMPE e HARVERY, 1989). São altamente específicas para os substratos e dirigem todos os eventos metabólicos. As enzimas digestivas têm um sítio ativo que permite sua atuação na ruptura de uma determinada ligação química, sob condições favoráveis de temperatura, pH e umidade (PENZ JÚNIOR, 1998)

Atualmente, através da utilização de biotecnologias mais modernas é possível avançar no que se diz respeito à produção industrial de enzimas específicas, atuantes em determinadas áreas de aplicação. Na nutrição animal, se tem registros que a produção de enzima atingiu a escala comercial a partir de 1980. Diversos tipos de fungos, bactérias e leveduras podem ser utilizados para produção de aditivos enzimáticos.

A incorporação de enzimas como forma de aditivo alimentar, as rações de animais é mais comum em monogástricos, com o propósito de melhorar o desempenho e, com isso sua rentabilidade. No entanto, são

escassas as informações sobre efeito de enzimas exógenas na digestibilidade das frações nutritivas da ração fornecida a bovinos (GUIMARÃES et. al., 2009).

As enzimas utilizadas em rações para animais podem ser divididas em dois tipos: enzimas destinadas a complementar quantitativamente as próprias enzimas digestórias endógenas dos animais e enzimas que esses animais não podem sintetizar ou sintetizam em pequenas proporções (CAMPESTRINI et al, 2005)

O aumento na quantidade de enzimas disponíveis no ambiente ruminal pode potencializar as enzimas endógenas específicas produzidas pelos microrganismos ruminais e contribuir, portanto, na melhora da digestibilidade dos nutrientes da dieta (BRITO, 2010). De acordo com YIN et al. (2001), os aditivos enzimáticos não possuem função nutricional direta, mas auxiliam o processo digestivo, contribuindo assim para a melhora da digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta.

Desta forma, BRITO (2010), avalia que os gastos com alimentação representam a maior proporção dos custos totais de produção da pecuária, por isso, maximizar a utilização dos nutrientes é essencial para manter a sustentabilidade do sistema.

As principais metas da suplementação enzimática para os animais são: remover ou destruir os fatores antinutricionais dos grãos, aumentar a digestibilidade total da ração, potencializar a ação das enzimas endógenas e diminuir a poluição ambiental causada por nutrientes excretados nas fezes (GUENTER, 2002).

BEAUCHEMIN et al. (1995), enfatizaram que os aditivos enzimáticos em dietas para ruminantes deveriam ser reavaliados após constarem resultados de melhora do desempenho animal com a utilização de soluções enzimáticas na dieta. A melhora do desempenho animal dependerá do seu estado fisiológico, bem como das condições experimentais.

Portanto, o número limitado de produtos enzimáticos para ruminantes faz necessário o desenvolvimento de mais pesquisas, para que assim se consiga avaliar melhor a variabilidade nos efeitos desejados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local e período experimental

O experimento foi conduzido no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012, no Laboratório de Enzimologia e Laboratório de Fisiologia da Digestão do Instituto de Ciências Biológicas/ICB II, e também utilizou-se de um bovino fistulado que permaneceu nas dependências do Confinamento da Escola de Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Goiás, localizado no município de Goiânia – Goiás.

#### 3.2. Linhagem utilizada e manutenção do fungo

A amostra do fungo *Aspergillus awamori* utilizada no trabalho foi isolada de amostra de solo na Universidade de Brasília. Para manutenção do fungo, utilizou-se de placas de Petri, contendo meio MEX, constituído de extrato de malte 3,0% (p/v) e Ágar 2,0% (p/v), autoclavado a 120° C por 20 minutos. A cultura foi mantida por 10 dias a 30°C, e posteriormente as placas foram estocadas a 4° C.

#### 3.3. Produção da solução de enzimas amilolíticas

Para a produção da solução enzimática, cinco discos de cultura (5 mm), com esporos do *A awamori*, foram retirados das placas de cultivo e inoculados em erlenmeyers de 1,0 L, contendo 250 mL de meio de indução (fonte de carbono 10 g/L, extrato de levedura 10 g/L, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1 g/L, sulfato de magnésio 0,5 g/L, sulfato de ferro 0,1/L e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/L). Forragem de milho, moído em moinho com peneira de crivo de 1 mm, foi utilizado como fonte de carbono. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (Controlled Environment Incubator Shaker, Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A) à 30 °C e velocidade de 180 rpm. Após 72 horas de cultivo, a solução enzimática foi filtrada a vácuo. Alíquotas foram retiradas e congeladas para avaliação da atividade de amilase e avaliação da digestibilidade *in vitro* quando aplicada no milho moído em diferentes concentrações.

### 3.4. Ensaio enzimático

A atividade amilolítica foi determinada pelo método sacarificante que se baseia na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959).

A 40µl de tampão citrato-fosfato (50 mmol. L<sup>-1</sup>, pH 6,8), foram adicionados 60µl de amostra enzimática e 100µl de solução de amido (0,5%). A mistura foi incubada a 40°C por 10 minutos. Posteriormente, 1,0 mL de reagente ácido dinitrosalicílico {10 g.L<sup>-1</sup> ácido dinitrosalicílico (DNS), 100 mL de NaOH (2 mmol.L<sup>-1</sup>), 300 g.L<sup>-1</sup> de tartarato de sódio e potássio} foi adicionado nos tubos de ensaio. A mistura foi fervida por 10 minutos em banho-maria a 96°C e a absorbância determinada a 550nm. A quantidade de açúcares redutores formados é calculada de acordo com uma curva padrão de glicose (MILLER, 1959). Uma unidade (U) de atividade sacarificante foi definida como a quantidade de enzima que libera 0,1 mg de açúcar redutor por minuto de reação.

### 3.5. Digestibilidade “*in vitro*” da matéria seca do milho e delineamento experimental

Tratamento controle – 0 unidades enzimáticas/ Kg de matéria seca do milho.

Tratamento Nível 1 – 5ml de enzima em 24g de milho, o que corresponde a 216 unidades enzimáticas/ Kg de matéria seca do milho.

Tratamento Nível 2 – 10ml de enzima em 24g de milho, o que corresponde a 432 unidades enzimáticas/ Kg de matéria seca do milho.

Tratamento Nível 3 – 20ml de enzima em 24g de milho, o que corresponde a 864 unidades enzimáticas/ Kg de matéria seca do milho.

A digestibilidade *in vitro* foi determinada pela metodologia do fermentador ruminal (DAISY<sup>II</sup>/ANKOM<sup>®</sup>), descrita por HOLDEN (1999).

Para dar início ao processo que determina a digestibilidade *in vitro*, foi necessário colocar todos os materiais que eram utilizados, na temperatura de 39 °C. Incluindo uma garrafa térmica que era levada a campo para o transporte do líquido ruminal.

Para a coleta do líquido ruminal utilizou-se um bovino nelore, com peso médio de 550 kg e munido de fístula ruminal. O animal foi mantido em baia, confinado enquanto durou o experimento. A dieta padrão consistiu de volumoso à vontade e 1 kg de milho/dia, com adaptação de 14 dias anteriores a retirada do líquido ruminal. A coleta de líquido ruminal procedeu-se manualmente com a retirada do conteúdo ruminal de vários pontos do rúmen.

Ao retornar para o laboratório, este material coletado e adicionado em garrafa térmica era rapidamente processado em um liquidificador com infusão de CO<sub>2</sub>, por 30 segundos para homogeneização, e posteriormente filtrados em um de tecido de algodão limpo, assim, preparados para serem inseridos nos jarros (Figura 4). Em cada jarro foi adicionado 400 ml de líquido ruminal e 1596 ml de solução tampão.



FIGURA 4 Etapas da preparação do líquido ruminal.

As soluções tampões A e B (compõem a solução tampão de Kansas) foram misturadas nas quantidades de 266 mL da solução B a 1330 mL da solução A (1:5). A exata quantidade de A em relação a B foi ajustada para obter pH final de 6,8 a 39°C. Esta solução era pré-aquecida a 39 °C, já na incubadora, anteriormente a sua mistura com o líquido ruminal.

Para a preparação do material a ser incubado, foi realizada a identificação dos sacos de filtros (F57 ANKOM<sup>®</sup>), colocados em estufa a 105 °C, e posteriormente colocados em dessecador por 40 minutos, tendo assim seu peso registrado.

Após este processo, foi adicionado em cada saco de filtro amostras de 0,5 g do milho moído (moinho tipo “Willey”, cm peneira de crivo 1mm), tratados com a quantidade de enzima a ser testada. Logo após, os sacos eram selados e incubados nos jarros que já continham o líquido ruminal e solução tampão, a 39°, em meio anaeróbio.

Cada tratamento foi feito individualmente nos jarros da incubadora. As amostras tratadas (duplicata) foram retiradas nos tempos 0, 6, 12, 18, 24 e 48 horas, perfazendo um subtotal de 12 sacos de filtro por jarro, 1 jarro por tratamento. Foram realizadas duas baterias por tratamento, utilizado no total 96 sacos, em cada tratamento. Além do saco correspondente ao branco e o saco controle.

A DIVMS dos substratos tratados foi determinada nos tempos 0, 6, 12, 18, 24 e 48 horas de incubação a 39°C. Após os períodos, os saquinhos foram lavados até a água ficar límpida no recipiente. Em seguida, os saquinhos foram colocados em estufa a 105°C por 24 horas e, após 40 minutos no dessecador, o peso foi registrado.

A digestibilidade in vitro da MS foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{DIVMS} = 100 - \{[\text{PF} - (\text{PS} \times \text{FC}) / \text{PA} \times \text{MS}] \times 100\}$$

Em que: PF: peso final filtro, PS: peso filtro vazio, FC: fator de correção, PA: peso amostra, MS: matéria seca da amostra.

### 3.6. Análise estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em parcelas subdivididas onde cada jarro de incubação foi considerado como um rúmen artificial e uma parcela sendo a média dos dois saquinhos retirados em cada tempo foi considerada uma repetição. Para a determinação da digestibilidade

“*in vitro*”, foi utilizado o modelo matemático Logístico modificado (MELLO et al. 2008):

$$\text{Dig (t)} = \frac{D}{1+e^{(2-4k(t-l))}} + \varepsilon$$

Onde :

Dig (t)= Digestibilidade *in vitro* no tempo (t)

D=Digestibilidade potencial

e= Logarítmo natural

k= taxa específica de desaparecimento

t= tempo de incubação

l=Tempo de colonização

$\varepsilon$ = erro experimental associado a cada observação

As curvas obtidas e os parâmetros de digestibilidade potencial e tempo de colonização foram analisadas e os parâmetros comparados pelo teste de identidade de modelos (REGAZZI, 2003) ao nível de significância de 5%, e os parâmetros de digestibilidade potencial e tempo de colonização foram comparados e com o auxílio do programa estatístico R (R, Development Core Team, 2010).

As médias dos valores de digestibilidade “*in vitro*” (%) da matéria seca do milho moído nos tempos de incubação foram submetidas a análise de variância e das médias comparadas pelo teste de Tuckey a 5% com o auxílio do software estatístico ASSISTAT (SILVA & AZEVEDO, 2009)

As doses enzimáticas foram analisadas pelo modelo de regressão linear e não linear com o auxílio do programa estatístico R (R, Development Core Team, 2010).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de enzimas amilolíticas influenciou positivamente no aumento da degradação do milho no nível 3 até o tempo de 24h em relação ao tratamento controle, conforme apresentado na Tabela 2, podendo este fato ser atribuído à atuação enzimática no substrato a partir do momento que foi aplicada a enzima, corroborando com resultado encontrado por ROJO et al. (2005) que verificaram incremento na digestibilidade suplementando cordeiros com dietas à base de sorgo contendo  $\alpha$ -amilase, verificando um efeito linear na digestão ruminal do amido.

Entre os níveis de adição enzimática, a digestibilidade da matéria seca foi aumentada até o tempo de 18 horas com a adição do maior nível (nível 3) em relação aos menores níveis não corroborando com os resultados encontrados por ROJO et al. (2005) em que houve um efeito quadrático na digestibilidade aparente da matéria seca das dietas, em que níveis intermediários de adição enzimática apresentaram maior digestibilidade da matéria seca. Resultados diferente ao resultado encontrado por HRISTOV et al. (1998) que utilizando a infusão direta no rúmen de tratamento com enzimas amilolíticas exógenas de uma dieta contendo silagem de milho e cevada como fonte de amido, não encontraram diferença na fração solúvel.

Tabela 2 – Médias dos valores de digestibilidade “*in vitro*” (%) da matéria seca do milho moído nos tempos de incubação

Tratamentos	Tempos											
	0 h		6 h		12 h		18 h		24 h		48 h	
Controle	2.43	cF*	8.26	cE	27.72	cD	45.18	bC	55.95	bB	79.73	aA
Nível 1	12.66	bE	17.14	bE	31.71	bcD	40.35	cC	50.38	cB	81.83	aA
Nível 2	17.39	aE	20.96	bE	35.09	bD	47.99	bC	57.83	abB	77.50	aA
Nível 3	21.52	aF	28.06	aE	43.21	aD	55.40	aC	61.44	aB	81.96	aA

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade

CV (%) Coluna= 7,25

CV (%) Linha= 5,75

A ação hidrolítica direta das enzimas sobre o substrato específico de cada enzima aumenta a quebra da estrutura do amido no substrato,

favorecendo assim o aumento da colonização do substrato pelos microorganismos ruminais devido ao aumento da área para adesão, elevando com isso o fornecimento de substrato para o crescimento da população de microrganismos no rúmen (MCALLISTER et al., 2001; BEAUCHEMIN et al., 2003). Aumentos da taxa de degradação da dieta no rúmen estão relacionados à maior facilidade na colonização dos alimentos pelas bactérias em relação do tratamento enzimático (COLOMBATTO et al., 2003).

Os processamentos físicos como a moagem e a floculação também propiciam o aumento da digestibilidade do milho pelo aumento da superfície específica favorecendo a ação enzimática e adesão bacteriana aos grânulos de amido e a quebra da matriz protéica que envolve os grânulos de amido, também incrementa a ação enzimática das proteases na matriz protéica no rúmen e no intestino (PEREZ, 2011).

O fato de uma maior disponibilidade ruminal do amido pode provocar uma queda do pH, resultando assim em uma maior fermentação ruminal favorecendo a fermentação láctica provocando uma menor eficiência no aproveitamento da energia da dieta, queda brusca do pH ruminal e o prolongamento da permanência do pH abaixo de 5,5 poderá provocar uma menor eficiência na digestão da fibra, diminuição do consumo voluntário da dieta e em casos mais graves ocorrer um quadro de acidose, o que prejudica o ganho de peso podendo levar o animal a um baixo desempenho (OWENS et al., 1997).

Efeito positivo no ganho de peso de novilhas foi evidenciado nos primeiros 28 dias de confinamento por TRICARICO et al. (2007) quando foi utilizado um nível de 580U de enzima amilolítica /kg de matéria seca na suplementação de novilhas confinadas utilizando casca de algodão como fonte de volumoso e atribuiu este melhor desempenho a atividade da enzima e à disposição de proteína prontamente degradável no rúmen para a síntese bacteriana.

No tempo de 48 horas não foi observada diferença significativa entre os tratamentos conforme apresentado na Tabela 2 e Figura 5, indicando que houve uma compensação na digestibilidade da matéria seca entre os tratamentos após as 24 horas para o tratamento controle e após as 18 horas para os níveis 1 e 2, fato este podendo ser aliado ao fato de haver atividade

proteolítica no líquido ruminal presente nos jarros do fermentador, que por sua vez poderá destruir as enzimas inativando-as.

A estabilidade enzimática ruminal é fundamental para a sua atividade e um fator primordial para que essa possa desempenhar a sua função. A presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no ambiente ruminal é importante para a manutenção da atividade enzimática da amilase, cálcio este proveniente da dieta e se liga a enzima e esta ligação confere funcionalidade enzimática e mantém a sua estrutura (BOEL et al., 1990).

VAN DE VYVER et al. (2004) utilizaram glicosilação como forma de proteção da enzima xilanase contra diversas proteases produzidas por microrganismos ruminais e verificaram redução da atividade da enzima glicosilada incubada com várias proteases nas 6 primeiras horas, em relação a enzima não tratada entretanto, após 24 horas de incubação a enzima tratada manteve a sua atividade e a enzima não tratada apresentou mais de 60% de perda na sua atividade. A glicosilação da enzima mostrou-se eficaz em manter a atividade enzimática na presença de proteases.

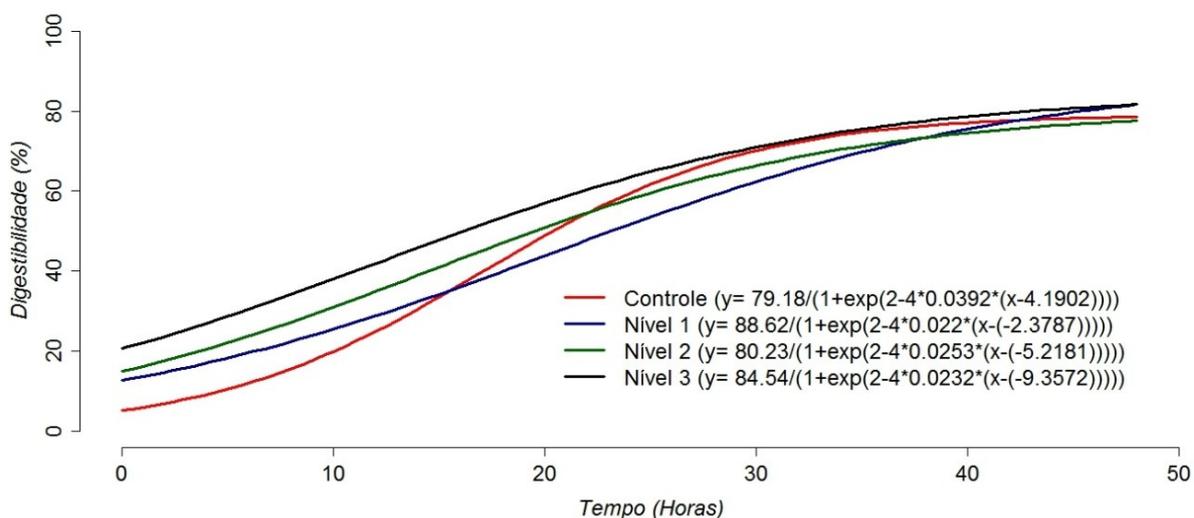


Figura 5 – Curvas de Digestibilidade “*in vitro*” da matéria seca do milho moído com 3 níveis de adição enzimática e controle.

Tabela 3 – Valores dos parâmetros da degradação da matéria seca: fração solúvel (a), fração potencialmente degradável (b), degradabilidade efetiva a taxa de passagem de 2% (DE 2%), 5% (DE 5%) e 8% (DE 8%), tempo de colonização (Lag time), degradação potencial (DP), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  Ajustado).

Parâmetros	Tratamentos			
	Controle	Nível 1	Nível 2	Nível 3
a (%)	5,19	12,69	14,98	20,64
b (%)	73,39	68,94	62,62	60,99
c (%)	3,92	2,21	2,53	2,32
DE 2% (%)	78,74	82,69	78,07	82,10
DE 5% (%)	48,90	43,87	50,92	57,02
DE 8% (%)	26,33	29,73	35,98	42,94
Lag Time (horas)	4,19a	0b	0b	0b
DP (%)	78,58ab	81,63a	77,60b	81,63a
$R^{2\#}$	0,9364	0,9267	0,9718	0,9337
$R^2$ Ajustado <sup>#</sup>	0,9336	0,9234	0,9706	0,9307
Coef. Variação (%) <sup>#</sup>	19,28	17,11	8,60	11,54

<sup>#</sup>Coeficiente das curvas de digestibilidade de cada tratamento

O tempo de colonização do milho foi diminuído pela adição enzimática, conforme apresentado na Tabela 3, fato atribuído à ação enzimática aumentando a superfície de contato e fornecendo oligossacarídeos de cadeias menores para as bactérias, proporcionando melhores condições ao crescimento bacteriano.

A degradação potencial não foi influenciada pela adição enzimática em relação ao tratamento controle indicando que a degradação ruminal é compensada à medida que a taxa de passagem do alimento é diminuída. Dados semelhantes foram verificados por COOPER et al. (2002) estudando a taxa de digestão e passagem “*in situ*” do milho floculado, moído e em silagem de grão úmido em novilhas, onde a taxa de degradação ruminal foi aumentada à medida que a taxa de passagem diminuía.

Estudos “*in vitro*” e “*in situ*” evidenciaram incremento na degradação ruminal da matéria seca e do amido do milho e sorgo pela adição de enzimas amilolíticas exógenas (GUTIÉRREZ et al. 2005; ROJO et al., 2005), e são atribuídos a efeitos diretos, pela ação enzimática e por efeitos indiretos pela redução da população de protozoários. Os protozoários reduzem a taxa e a

extensão da extensão da digestão ruminal (MENDOZA et al. 1993). O efeito de redução dos protozoários ciliados está associado à diminuição do pH ruminal devida a elevada taxa de fermentação ruminal.

No presente trabalho os níveis enzimáticos que promoveram diferentes curvas de regressão da digestibilidade em relação ao nível enzimático nos tempos de incubação sendo a dose que apresentou maior degradabilidade foram de 17,8 e 16,4 mL para os tempos 0 e 24 horas de incubação respectivamente, correspondendo a 769,2 e 708,7 unidades enzimáticas/ Kg de matéria seca do milho conforme demonstrado no ficando abaixo do nível de maior digestibilidade encontrado por ROJO et al (2005) foi de 2830,4 unidades enzimáticas/ Kg de matéria seca de sorgo e acima do resultado encontrado por TRICARICO et al. (2005) que foi de 594,5 unidades enzimáticas/ Kg de matéria seca de milho.

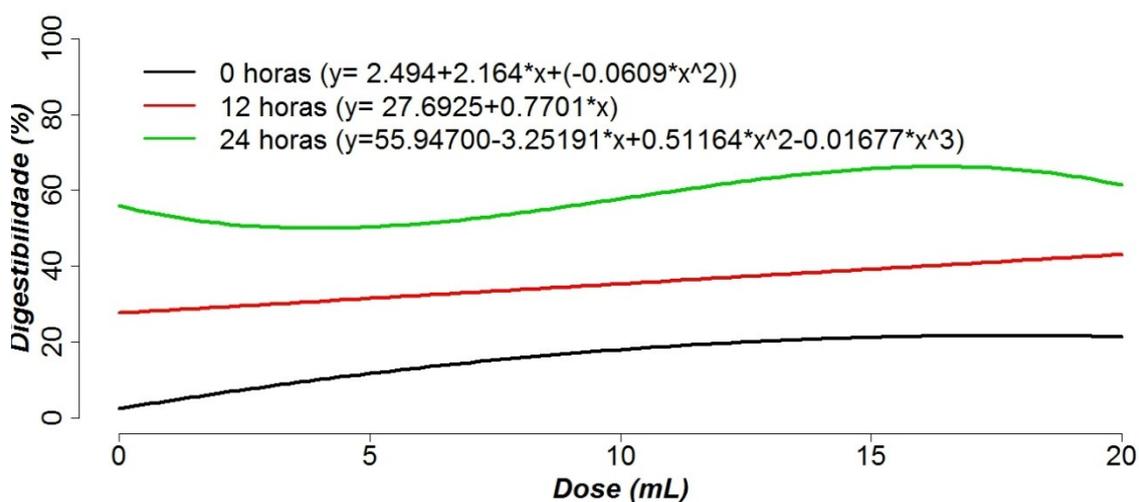


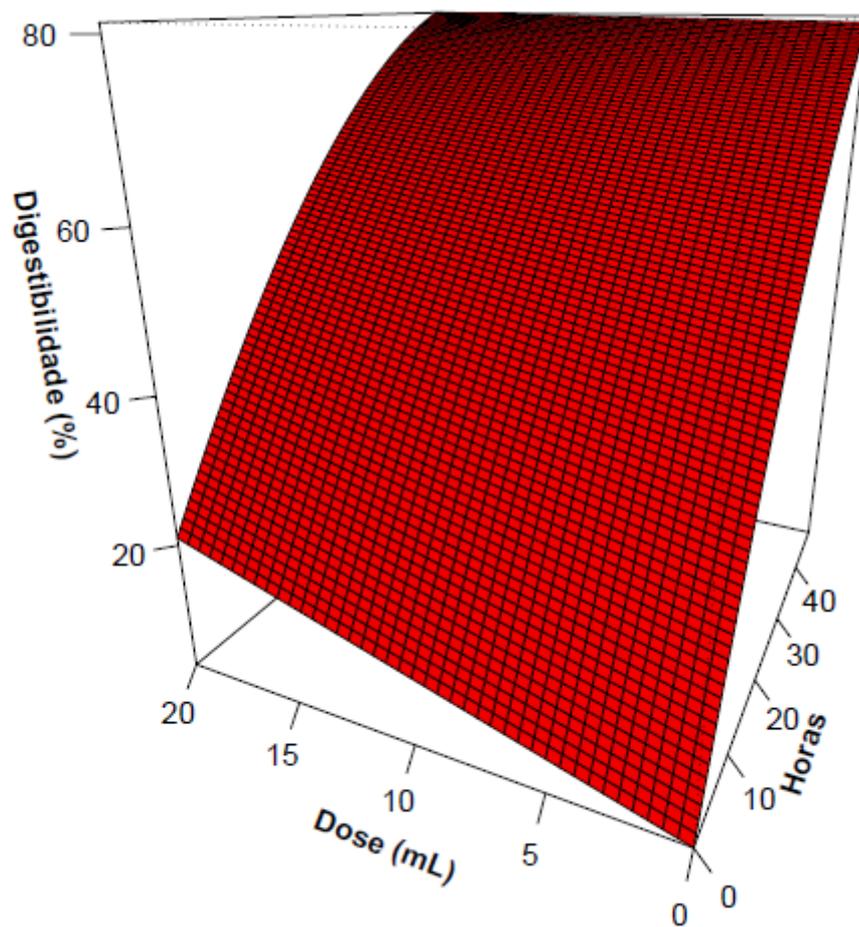
Figura 6 – Regressão da digestibilidade da matéria seca em relação ao nível de adição enzimática nos tempos de 0, 12 e 24 horas.

Tabela 4 – Valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  Ajustado) e coeficiente de variação das curvas de regressão da digestibilidade da matéria seca em relação ao nível de adição enzimática nos tempos.

Parâmetros	Tempo de incubação		
	0 horas	12 horas	24 horas
Dose para máxima digestibilidade.	17,8 mL	20 mL	16,4 mL
$R^{2\#}$	0,8115	0,3925	0,3996
$R^2$ Ajustado <sup>#</sup>	0,7985	0,3722	0,3353
Coef. Variação (%) <sup>#</sup>	27,13	21,25	9,28

A Figura 7 representa a digestibilidade "in vitro" da matéria seca do milho em relação à dose enzimática e ao tempo, e mostra que a digestibilidade ruminal é variável com o tempo de permanência do milho no rúmen e ao nível enzimático aplicado, sendo maiores os efeitos nas taxas de passagem maiores e não havendo diferença quando este atinge o tempo de permanência ruminal de 48 horas. TRICARICO et al. (2005) com a adição de 594,5 unidades enzimáticas/ Kg de matéria seca de milho e taxa de passagem de 8% / hora encontraram resultados semelhantes.

Figura 7 – Gráfico 3D da digestibilidade "in vitro" da matéria seca do milho em relação à dose enzimática e ao tempo.



## 5. CONCLUSÕES

A utilização de enzimas amilolíticas exógenas melhorou a digestibilidade “*in vitro*” da matéria seca do milho moído.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADESOGAN, A.T. Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM Daisy<sup>II</sup> incubators. **Animal Feed Science and Technology**, v.119, p.333-344, 2005.
2. BARNES, R.F. Use of *in vitro* fermentation techniques for estimating forage digestibility and intake. **Agronomy Journal**, 1965. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000082&pid=S1516-359820000020002900001&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000082&pid=S1516-359820000020002900001&lng=en). Acesso em: 03 ago. 2012.
3. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; W, Z. YANG.; McALLISTER, T. A. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: PACIFIC NORTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 33<sup>rd</sup>, 1998. Vancouver. **Proceedings...**Vancouver, 1998. 14 p. Disponível: [http://www.animal-science.org/content/81/14\\_suppl\\_2/E37.short](http://www.animal-science.org/content/81/14_suppl_2/E37.short). Acesso: 28 jul. 2012.
4. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal Animal Science**, v. 75, p. 641-644, 1995.
5. BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, P. D.; YANG, Z. W. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 81, suppl. 2, p. 37-47, 2003.
6. BRITO.F.O. **Níveis de complexo enzimático em dietas para ruminantes**. Tese de mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga/SP, 2010.
7. BOEL, E.; BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z.; DODSON, G. G.; JENSEN, V. J.; PETERSEN, S. B.; SWIFT, H.; THIM, L.; WOLDIKE, H. F. Calcium binding in  $\alpha$ -amylases: An x-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. **Biochemistry**. v.29, p.6244–6249, 1990.
8. BULEÓN, A.; COLONNA, P., PLANCHOT, V. BALL, S. Starch granules: structures and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. Nantes, v. 23, p. 85-112, 1998.
9. CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M da; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n.6, p.254-267, 2005.
10. CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Enzimas. In: Bioquímica Ilustrada, 2 ed. São Paulo: Artes médicas. 446p. p.53-66, 1989.
11. CHERNEY, D.J.R., SICILIANO, J.J., PELL, A.N. Technical note: forage *in vitro* dry matter digestibility as influenced by fiber source in the donor cow diet. **Journal of Animal Science** 71(5):1335-1338, 1993. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000084&pid=S1516-359820000020002900003&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000084&pid=S1516-359820000020002900003&lng=en). Acesso em: 04 ago. 2012.

12. COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; FURTADO, BEAUCHEMIN, K. A. Screening of exogenous enzyme for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 2628 – 2638, 2003
13. COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus Níger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 203 p., 1996.
14. DE FRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEUR, K. F.; TRICARICO, J. M. Effects of dietary  $\alpha$ -amylase on metabolism and performance of transition dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.12, p.4405-4413, 2005
15. DEMARQUILLY, C. Quelles Méthodes - Pour quels objectifs. In: Colloque maïs ensilage, 1996. Nantes-France, p. 87-91, Nantes, 1996.
16. DUTRA, A.R., QUEIROZ, A.C., PEREIRA, J.C. Efeito dos níveis de fibra e das fontes de proteína sobre o consumo e digestão dos nutrientes em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, 26(4):787-796, 1997.
17. FLORES, M.P.; CAST, A.J.; MCNAB, J.M. Effect of enzyme supplementation to improve the nutritive and value of triticale in poultry diets. **Animal Feeds Science and Tecnology**, Amsterdam, v.39, n.3, p. 237-243, 1994.
18. FOOD CHEMICAL CODEX. Imprensa Acadêmica Nacional, Washington, DC. 1996.
19. FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.
20. GRANT, R.J., VAN SOEST, P.J., McDOWELL, R.E. 1974. Influence of rumen fluid source and fermentation time on *in vitro* true dry matter digestibility. **Journal of Dairy Science** 57(2):1201-1205. Link: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000091&pid=S1516-3598200000020002900010&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000091&pid=S1516-3598200000020002900010&lng=en). Acesso em: 04 ago. 2012.
21. GUENTER, W. Practical experience with the use of enzymes. 2002. Disponível na Internet: [http://www.idrc.ca/en/ev-30924-01-1-DO\\_TOPIC](http://www.idrc.ca/en/ev-30924-01-1-DO_TOPIC). Acesso em: 03 ago. 2012.
22. GUIMARÃES. I.G, FALCON. D.R., SCHICH.D., BARROS.M.M, PEZZATO.L.E., Digestibilidade aparente de rações contendo complexo enzimático para tilapia-do-nilo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. vol.61 n.6 Belo Horizonte. 2009.
23. GUTIÉRREZ, C., MENDOZA, G.D., RICALDE, R., MELGOZA, L.M., PLATA, F.,. Effect of exogenous amylase or glucoamylase dose on *in situ* ruminal digestion of corn and sorghum. **Journal Applied Animal Research**. 27, 35–37. 2005

24. HARGER, C.; SPRADA, D. ; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**, 1982. 56 p.
25. HOLDEN, L.A. Comparison of methods of *in vitro* matter digestibility for ten feeds. **Journal Dairy Science**, v. 2, n. 8, p. 1791-1794, 1999.
26. HRISTOV, A. N.; BASEL, C. E.; MELGAR, A.; FOLEY, A. E.; ROPP, J. K.; HUNT, C.W.; TRICARICO, J. M. Effect of exogenous polysaccharide-degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**. N. 145, p. 182 – 193, 2008.
27. HUNTINGTON, G. B. Ruminant starch utilization progress has been extensive. Feedstuffs, **Journal of Animal Science**, p. 16 - 18 e 38 - 43, 1994.
28. HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**. v. 75, p.852-867, 1997
29. JOHNSON, R.N.; BALINANI, T.L.; JOHNSON, L.L. et al. Corn plant maturity. II. Effect on *in vitro* cellulose digestibility and soluble carbohydrate content. **Journal of Animal Science**, v.25, p.617-623, 1966.
30. KLINGERMAN, C. M.; HU, W.; McDONELL, E. E.; DERBROSIAN, M. C.; KUNG JUNIOR, L. An evaluation of exogenous enzyme with amylolytic activity for dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 1050-1059, 2009.
31. KOTARSKI, K.K.; WANISHA, R.D.; THURN, K.K. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. **Journal of Nutrition**, v.122, p.178-190. 1992
32. KOZLOSKI, V. G. Bioquímica microbiana ruminal. In: **Bioquímica dos ruminantes**. 1 ed. Santa Maria: UFMS, cap. 1, p. 124p. 2009.
33. MARINUCCI, M.T., DEHORITY, B.A., LOERCH, S.C. *In vitro* and *in vivo* studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fiber bags. **Journal of Animal Science**: p.296-307. 1992. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000093&pid=S1516-3598200000020002900012&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000093&pid=S1516-3598200000020002900012&lng=en). Acesso em 08 ago 2012.
34. MARTEN, G.C., BARNES, R.F. Prediction of energy digestibility of forages with *in vitro* rumen fermentation and fungal enzymes systems. In: Pigden, W.J., Balch, C.C., Graham, M. (Eds.) *Standardization of analytical methodology for feeds*. Ottawa: International Development Research Center, p.61-128. 1980. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000094&pid=S1516-3598200000020002900013&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000094&pid=S1516-3598200000020002900013&lng=en). Acessado em: 10 ago. 2012.
35. MARTINS, A. S.; PRADO, I.N.; ZEOULA, L.M.; BRANCO, A.F.; NASCIMENTO, W.G. Digestibilidade aparente de dietas contendo milho ou casca de mandioca como fonte energética e farelo de algodão ou levedura

- como fonte protéica em novilhas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p.269-277. 2000.
36. MENDOZA, G.D., BRITTON, R.A., STOCK, R.A. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. **Journal Animal Science** 71, 1572–1 1993.
37. MCALLISTER, T. A.; HRISTOV, A.N.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxon: Cab International, cap 11, p.273-298, 2001.
38. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959
39. MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, cap. 13, 222 – 242, 2004.
40. NELSON, B.D., ELLZEY, H.D., MONTGOMERY, C. et al. Factors affecting the variability of an in vitro rumen fermentation technique for estimating forage quality. **Journal Dairy Science**. p.358-366. 1973. Disponível em: <http://www.scielo.br/scieloOrg/php/similar.php?lang=en&text=Factors%20affecting%20the%20variability%20of%20an%20in%20vitro%20rumen%20fermentation%20technique%20for%20estimating%20forage%20quality>. Acesso em: 06 ago. 2012.
41. OWENS, F. N., SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: A review. **Journal of Animal Science**. v.75, p.868-879, 1997.
42. RODRIGUES, M. T. 1998. Uso de fibras em rações de ruminantes. In: Congresso Nacional dos Estudantes de Zootecnia – CONEZ – Viçosa – MG. **Anais...** Viçosa, 1998.
43. ROJO RUBIO, R., Mendoza, G.D., Gonzalez, S.S., Landois, L., Barcena, R., Crosby, M.M., Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. **Animal Feed Science Technology** 124, p.655–665, 2005.
44. ROJO RUBIO, R.; MARTÍNEZ, G. D. M.; VALDEZ, O. D. M.; REBOLLAR, S. R.; JIMENEZ, D. C.; MARTÍNEZ, J. H.; RAZO, F. J. G. Enzimas amilolíticas exógenas na em la alimentación de ruminantes. **Universidad y Ciencia**. Villahermosa n. 23, v. 02, p. 173 – 182, 2007
45. ROSTAGNO, H. S. Tabelas brasileiras para aves e suínos: **composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. p.186. 2005.
46. SAN EMETERIO, F.; REIS, R. B.; CAMPOS, W. E.; SATTER, L. D. Effect of coarse of fine grinding on utilization of dry or ensiled corn by lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.12, p.2839-2848, 2000.

47. SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.
48. SOUZA, E.L. ; HOFFMANN, E.H.E. ; CASTILHO, V.M. ; LIMA, V.A. ; BELLINI, M.Z.; CRUZ, V.D. ; CRUZ, R. Produção e Caracterização de  $\alpha$ -Amilase produzida por *Rhizopus* sp. In: **Arquivos Biológicos e Tecnologia** 39 (4). p. 831-839. 1996.
49. THEURER, C.B. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1649-1662, 1986. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000097&pid=S0100204X200400030001000022&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000097&pid=S0100204X200400030001000022&lng=en) Acessado em: 01 ago 2012.
50. TILLEY, J.M.A., TERRY, R.A. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**. Hurley, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.
51. TRICARICO, J. M., J. D. JOHNSTON, K. A. DAWSON, K. C. HANSON, K. R. MCLEOD, AND D. L. HARMON. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. **British Society of Animal Science**. v.81, p.365–374, 2005.
52. TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. <sup>a</sup> Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase. **Animal Feed Science and Technology**. v. 145, p 136-150, 2008.
53. TRICARICO, J.M.; ABNEY, M.D.; GALYEAN, M.L.; RIVERA, J.D.; HANSON, K.C.; MCLEOD, K.R.; HARMON, D.L. Effects of a dietary *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle. **Journal of Animal Science**. v.145, p.802–811, 2007.
54. VAN DE VYVER, W. F. J.; DAWSON, K. A.; CASEY, N. H.; TRICARICO, J. M. Effect of glycosylation on the stability of fungal xylanase exposed to proteases or rumen fluid in vitro. **Animal Feed Science and Technology**. v. 116, p 259-269, 2004.
55. VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p..
56. WALSH, G.; MURPHY, R. A.; KILLEEN, G. F.; POWER R. F. Quantification of supplemental enzymes in animal feedstuffs by radial enzyme diffusion. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.67 p.70–74, 2005.
57. WARNER, A.C.I. Criteria for establishing the validity of in vitro studies with rumen micro-organisms in so-called artificial rumen systems. **J. General Microbiol.**, 14:733-748. 1956.

58. WILMAN, D.; ADESOGAN, A. A comparison of filter bag methods with conventional tube methods of determining the in vitro digestibility of forages. ***Anim. Feed Sci. Technol.***, v.84, p.33-47, 2000.
59. YIN, Y.-L.; BAIDOO, S.K.; JIN, L.Z. et al. The effect of different carbohydrase and protease supplementation on apparent (ileal and overall) digestibility of nutrients of five hullless barley varieties in young pigs. *Livestock Production Science*, v.71, p.109-120, 2001.
60. MARTINS, A. S.; PRADO, I.N.; ZEOULA, L.M. et al. Digestibilidade aparente de dietas contendo milho ou casca de mandioca como fonte energética e farelo de algodão ou levedura como fonte protéica em novilhas. ***Revista Brasileira de Zootecnia***, v.29, n.1, p.269-277, 2000.